



(51) Clasificación Internacional de Patentes ⁶ : C07K 14/32, A61K 38/16, 35/74		A1	(11) Número de publicación internacional: WO 99/06441
			(43) Fecha de publicación internacional: 11 de Febrero de 1999 (11.02.99)
(21) Solicitud internacional: PCT/ES98/00219		(81) Estados designados: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZW, Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Fecha de la presentación internacional: 28 de Julio de 1998 (28.07.98)			
(30) Datos relativos a la prioridad: P 9701666 29 de Julio de 1997 (29.07.97) ES			
(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): CHACON PABON, Rafael [ES/ES]; Carretera de Guadarrama, San Lorenzo del Escorial, km. 4, E-28200 San Lorenzo del Escorial (ES).		Publicada Con informe de búsqueda internacional.	
(72) Inventor; e			
(75) Inventor/solicitante (sólo US): CHACON MEJIAS, Fernando [ES/ES]; Carretera de Guadarrama, San Lorenzo del Escorial, km. 4, E-28200 San Lorenzo del Escorial (ES).			
(74) Mandatario: UNGRIA LOPEZ, Javier; Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).			
(54) Title: PROTEINIC PRODUCT, PROCESS FOR ITS PREPARATION, COMPOSITIONS CONTAINING IT AND USE IN MEDICAMENTS			
(54) Título: PRODUCTO PROTEICO, PROCEDIMIENTO PARA SU PREPARACION, COMPOSICIONES QUE LO CONTIENEN, Y SU USO EN MEDICAMENTOS			
(57) Abstract			
<p>The invention discloses a proteinic product extracted from non-pathogenic bacillus and comprising proteins, peptides and other molecules obtained from the cellular lysis over at least one or the two sporulated and thermal resistant bacillus strains, in natural or modified form, and selected among a first group comprised of strains of <u>B. Licheniformis</u>, <u>B. Circulans</u> 2, <u>B. Pumilus</u>, <u>B. Macerans</u>, <u>B. Amilolicoufaciens</u>; a second group comprised of strains of <u>B. Cereus</u> 1, <u>B. Cereus</u> 2, <u>B. Lentus</u> 1, <u>B. Lentus</u> 2; a third group comprised of strains of <u>B. Subtilis</u>; a fourth group comprised of strains of <u>B. Mesentericus</u>. The invention also relates to a process for the preparation of the proteinic product, compositions which contain it and its use in the preparation of medicaments for the treatment of diseases related to syndromes of immunodeficiency, self-immunity, neoplastic processes, degenerative diseases, inflammatory intestinal diseases and infectious diseases.</p>			
(57) Resumen			
<p>Se describe un producto proteico extraído de bacilos apatógenos que comprende proteínas, péptidos y otras moléculas, obtenidos a partir de lisis celular de al menos una de las de cepas de bacilos termoresistentes y esporulados, naturales o modificadas, y seleccionadas: un primer grupo compuesto por cepas de <u>B. Licheniformis</u>, <u>B. Circulans</u> 2, <u>B. Pumilus</u>, <u>B. Macerans</u>, <u>B. Amilolicoufaciens</u>; un segundo grupo compuesto por cepas de <u>B. Cereus</u> 1, <u>B. Cereus</u> 2, <u>B. Lentus</u> 1, <u>B. Lentus</u> 2; un tercer grupo compuesto por cepas de <u>B. Subtilis</u>; un cuarto grupo compuesto por cepas de <u>B. Mesentericus</u>. También se describe un procedimiento de preparación del producto proteico, composiciones que lo contienen y su uso en la preparación de medicamentos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con síndromes de inmunodeficiencia, autoinmunidad, procesos neoplásicos, enfermedades degenerativas, enfermedades inflamatorias intestinales y enfermedades infecciosas.</p>			

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AL	Albania	ES	España	LS	Lesotho	SI	Eslovenia
AM	Armenia	FI	Finlandia	LT	Lituania	SK	Eslovaquia
AT	Austria	FR	Francia	LU	Luxemburgo	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabón	LV	Letonia	SZ	Swazilandia
AZ	Azerbaiyán	GB	Reino Unido	MC	Mónaco	TD	Chad
BA	Bosnia y Herzegovina	GE	Georgia	MD	República de Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tayikistán
BE	Bélgica	GN	Guinea	MK	Ex República Yugoslava de Macedonia	TM	Turkmenistán
BF	Burkina Faso	GR	Grecia	ML	Malí	TR	Turquía
BG	Bulgaria	HU	Hungría	MN	Mongolia	TT	Trinidad y Tabago
BJ	Benín	IE	Irlanda	MR	Mauritania	UA	Ucrania
BR	Brasil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarús	IS	Islandia	MX	México	US	Estados Unidos de América
CA	Canadá	IT	Italia	NE	Níger	UZ	Uzbekistán
CF	República Centroafricana	JP	Japón	NL	Países Bajos	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Noruega	YU	Yugoslavia
CH	Suiza	KG	Kirguistán	NZ	Nueva Zelanda	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	República Popular Democrática de Corea	PL	Polonia		
CM	Camerún	KR	República de Corea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakstán	RO	Rumania		
CU	Cuba	LC	Santa Lucía	RU	Federación de Rusia		
CZ	República Checa	LI	Liechtenstein	SD	Sudán		
DE	Alemania	LK	Sri Lanka	SE	Suecia		
DK	Dinamarca	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estonia						

PRODUCTO PROTEICO, PROCEDIMIENTO PARA SU PREPARACIÓN, COMPOSICIONES QUE LO CONTIENEN, Y SU USO EN MEDICAMENTOS

CAMPO DE LA TÉCNICA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se engloba dentro del campo de los fármacos destinados a la prevención y al tratamiento de enfermedades relacionadas con síndromes de inmunodeficiencia, autoinmunidad, procesos neoplásicos, enfermedades degenerativas, enfermedades inflamatorias intestinales y enfermedades infecciosas. Más concretamente, la invención se engloba en el sector de los fármacos obtenidos a partir de extractos proteicos de microorganismos.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR A LA INVENCIÓN

Los mecanismos de enfermedades relacionadas con síndromes de inmunodeficiencia, autoinmunidad, procesos neoplásicos, enfermedades degenerativas, enfermedades infecciosas e inflamaciones intestinales son complejos y, hasta la fecha, no existen fármacos que permitan la prevención y/o el tratamiento de los síndromes relacionados con los cuadros típicos de estas enfermedades con un grado de eficacia generalizado para los individuos enfermos, y que simultáneamente presenten una toxicidad lo suficientemente baja como para que su administración sea tolerada sin efectos secundarios por el individuo tratado.

En los últimos tiempos, se han tratado con éxito esperanzador los síntomas del SIDA mediante combinaciones de medicamentos. Sin embargo, una parte sustancial de los individuos tratados no responde favorablemente a estos "cócteles" de medicamentos que, además son extremadamente caros y precisan un rígido programa de administración con tomas muy frecuentes y producen efectos secundarios adversos en los pacientes.

Existe una intensa investigación basada en la creación de moléculas artificiales y el aislamiento de moléculas de productos naturales, para generar fármacos que

puedan combatir enfermedades de difícil o imposible curación como muchas de las anteriormente mencionadas. Básicamente, la investigación va dirigida a encontrar moléculas que inhiban o bloquen determinados mecanismos 5 intracelulares y/o metabólicos que se consideran responsables de las enfermedades, tales como las enfermedades neoplásicas y enfermedades relacionadas con el inmunosistema.

Otros tipos de tratamientos, tales como los 10 tratamientos con interferón, considerados muy esperanzadores en su momento pero criticados en algunos sectores últimamente, son los que combaten las enfermedades mediante el fortalecimiento del sistema inmunológico del paciente.

15 En las patentes españolas ES-A-348986, ES-A-410892 y ES-A-414437 describen "vacunas anticancerosas" y su procedimiento de preparación, basadas en extractos obtenidos mediante bacteriolisis de cepas de Bacilos no-20 termorresistentes y no-esporulados cuyos lisados demostrarán una relación positiva en orden a especificidad frente a suero de enfermos afectados por neoplasias. Las "vacunas" descritas en estas patentes españolas, si bien llegaron a emplearse con éxito en una gran cantidad de 25 ensayos clínicos, eran relativamente complicada de preparar en vistas de que se preparaban en función de cada paciente a tratar.

OBJETO DE LA INVENCIÓN

Es un objeto de la presente invención poner a disposición un fármaco para la prevención y el tratamiento 30 de enfermedades relacionadas con síndromes de inmunodeficiencia, enfermedades autoinmunes, procesos neoplásicos y degenerativos, enfermedades infecciosas y enfermedades infecciosas intestinales, particularmente para la prevención y el tratamiento de individuos afectados por 35 trastornos, como por ejemplo:

- síndromes de inmunodeficiencias, entre los que se encuentran los originados por el SIDA y la linfocitopenia T CD4 idiopática;
- síndromes de autoinmunidad, tales como los originados por esclerosis múltiple, Lupus eritematoso sistémico, artritis reumatóide, espondilitis anquilosante, psoriasis y otros de etiopatogenia similar;
- procesos neoplásicos, tales como los originados por leucemias, mielomas, linfomas, tumores cerebrales y de la médula espinal, cáncer de piel, neoplasia de tiroides, neoplasia de glándulas suprarrenales, tumores del aparato genitourinario masculino y femenino, tumores cardíacos, tumores del tracto gastrointestinal, tumores de pleura y mediastino, neoplasias de huesos y cartílagos;
- con síndromes relacionados con enfermedades degenerativas, tales como la artrosis;
- con enfermedades inflamatorias intestinales tales como la enfermedad de Crohn;
- con todos los tipos de hepatitis; y
- con enfermedades causadas por priones, tales como la encefalopatía espongiforme subaguda (enfermedad de Creutzfeldt-Jakob), presentando a la vez una alta eficacia y una práctica ausencia de efectos secundarios nocivos para el individuo tratado.

Es otro objeto de la invención poner a disposición un fármaco con las cualidades anteriormente descritas y que además pueda obtenerse de una forma simple y económica.

Es un ulterior objeto de la invención, poner a disposición un procedimiento para la obtención de un fármaco de las cualidades anteriormente descritas, cuyo proceso resulte suficientemente simple y estandarizable como para que pueda llevarse a cabo en condiciones económicas y masivas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Los objetos anteriormente mencionados se consiguen mediante un producto proteico que comprende proteínas, péptidos y otras moléculas, obtenidos a partir de lisis celular de al menos una de las de cepas de bacilos termorresistentes y esporulados, seleccionadas de al menos uno de los siguientes grupos:

- un primer grupo compuesto por cepas de B. Licheniformis, B. Circulans 2, B. Pumilus, B. Macerans, B. Amilolicofaciens, y cepas modificadas de las mismas;
- un segundo grupo compuesto por cepas de B. Cereus 1, B. Cereus 2, B. Lentus 1, B. Lentus 2 y cepas modificadas de las mismas;
- un tercer grupo compuesto por cepas de B. Subtilis y cepas modificadas de las mismas;
- un cuarto grupo compuesto por cepas de B. Mesentericus y cepas modificadas de las mismas.

En una realización de la invención, el producto según la invención comprende

- al menos una primera fracción de proteínas, péptidos y moléculas obtenidas a partir del fraccionamiento celular, seleccionada entre extractos de B. Licheniformis, B. Circulans 2, B. Pumilus, B. Macerans, B. Amilolicofaciens;
- al menos una segunda fracción de proteínas, péptidos y moléculas obtenidas a partir del fraccionamiento celular, seleccionada entre extractos de B. Cereus 1, B. Cereus 2, B. Lentus 1, B. Lentus 2;
- al menos una tercera fracción de proteínas, péptidos y moléculas obtenidas a partir del fraccionamiento celular, seleccionada entre extractos de B. Subtilis;
- al menos una cuarta fracción de proteínas, péptidos y moléculas obtenidas a partir del fraccionamiento celular, seleccionada entre extractos de B. Mesentericus.

En otra realización de la invención, el

producto según la invención comprende

- al menos un primer extracto que contiene proteínas, péptidos y moléculas, obtenido a partir del fraccionamiento celular a partir de cepas de bacilos del genero Subtilis;
- al menos un segundo extracto que contiene proteínas, péptidos y moléculas, obtenido a partir del fraccionamiento celular de cepas de bacilos del género Cereus;
- 10 - al menos un tercer extracto que contiene proteínas, péptidos y moléculas, obtenido a partir de cepas de bacilos del género Mesentericus;
- al menos un cuarto extracto que contiene proteínas, péptidos y moléculas, obtenido a partir de cepas 15 de bacilos del género Licheniformis;
- al menos un quinto extracto que contiene proteínas, péptidos y moléculas, obtenido a partir de cepas de bacilos del género Lentus;
- al menos un sexto extracto que contiene 20 proteínas, péptidos y moléculas, obtenido a partir de cepas de bacilos del género Pumilus.

Las cepas anteriormente mencionadas están seleccionadas entre cepas naturales y cepas modificadas.

Cuando se emplean cepas modificadas

- 25 - las cepas de bacilos del primer grupo pueden ser cepas modificadas CECT FCM-1 4913;
- las cepas de bacilos del segundo grupo pueden ser cepas modificadas CECT FCM-2 4914;
- las cepas de bacilos del tercer grupo pueden 30 ser cepas modificadas CECT FCM-3 4915;
- las cepas de bacilos del cuarto grupo pueden ser cepas modificadas CECT FCM-4 4916.

Las cepas anteriormente mencionadas han sido depositadas de acuerdo con lo dispuesto en el Tratado de 35 Budapest, en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)

en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia, con fecha del 25 de junio de 1997.

Así, las cepas modificadas

- 5 - B. Licheniformis, B. Pumilus B. Macerans, B. Amiloliquefaciens, han sido catalogadas con el numero de depósito CECT FCM-1 4913;
- B. Cereus, B. Lentus han sido catalogadas con el número de depósito CECT FCM-2 4914;
- 10 - B. Subtilis han sido catalogadas con el número de depósito CECT FCM-3 4915;
- B. Mesentericus ha sido catalogadas con el número de depósito CECT FCM-4 4916.

El producto proteico típicamente tiene las 15 siguientes características físicas:

Color amarillo
pH 7,0 ± 0,2
densidad aprox. 1 - 1,01
peso molecular 5.000 - 300.000 daltons

20 La invención también tiene por objeto un procedimiento para la obtención de un producto proteico de acuerdo con las características anteriormente mencionadas, que básicamente comprende la siguientes etapas:

Se selecciona al menos una cepa 25 termorresistente y esporulada de al menos uno de los siguientes grupos:

- un primer grupo compuesto por cepas de B. Licheniformis, B. Circulans 2, B. Pumilus, B. Macerans, B. Amiloliquefaciens, y cepas modificadas de las mismas;
- 30 - un segundo grupo compuesto por cepas de B. Cereus 1, B. Cereus 2, B. Lentus 1, B. Lentus 2 y cepas modificadas de las mismas;
- un tercer grupo compuesto por cepas de B. Subtilis y cepas modificadas de las mismas;
- 35 - un cuarto grupo compuesto por cepas de B.

Mesentericus y cepas modificadas de las mismas.

Seguidamente, se añade una inoculación de dicha cepa a una disolución acuosa de un medio de cultivo, para obtener un medio de cultivo inoculado. En una 5 realización del procedimiento, la disolución acuosa puede comprender entre 19 y 200g de un medio cultivo por cada litro de agua destilada. Preferentemente, la disolución acuosa se ajusta a un pH de 7.0 \pm 0,2 y se esteriliza en condiciones en sí convencionales, por ejemplo mediante 10 esterilización en autoclave a 121°C \pm 1°C durante 15 a 20 minutos.

La temperatura del medio de cultivo inoculado se ajusta en función de un crecimiento óptimo de la cepa. Preferentemente, la temperatura del medio de cultivo 15 inoculado se ajusta a una temperatura entre 18 a 40°C y se aplica ventilación forzada por aire filtrado al medio de cultivo inoculado durante toda la fase de crecimiento de la cepa, sometiéndose el medio de cultivo inoculado a una presión de aire de 0,5 a 1 l/min.

20 Se cultiva la cepa hasta alcanzar una densidad óptica máxima, obteniéndose un cultivo que contiene una masa bacilar y, seguidamente se obtiene un extracto proteico de la masa bacilar. Dicho extracto se obtiene mediante las etapas de

25 - separación de la masa bacilar del cultivo hasta obtener bacilos en suspensión por ejemplo mediante concentración celular de la masa bacilar en el cultivo mediante centrifugación, ciclón u otros procedimientos en sí convencionales, preferentemente, antes de la 30 concentración celular de la masa bacilar se separa y analiza una parte alícuota del cultivo antes de la concentración para obtener datos de "bacilos en suspensión" y también para obtener datos indicativos del grado de la concentración celular a efectos de poder controlar el 35 crecimiento bacilar;

- filtración cruzada sobre un filtro con un diámetro de poro inferior a 0,22 micras hasta obtener un cultivo concentrado con un rango de concentración de 10 a 20%.

5 Después, se somete el cultivo concentrado a diafiltración con intercambio de solución salina fisiológica. En una realización preferida del procedimiento el cultivo concentrado se somete a la diafiltración con un filtro de membrana con un tamaño de poro igual o inferior a 10 0,22 micras.

A continuación, se prepara un extracto que comprende proteínas, péptidos y moléculas que forman el principio activo mediante las fases de

15 - someter el cultivo concentrado a lisis celular, mediante un proceso criotérmico que comprende un ciclo con una primera fase a temperaturas entre 2 y 8°C durante varias horas y una segunda fase de frío a una temperatura inferior a -40°C durante al menos 8 horas, preferentemente a - 40 y -50°C durante 8 a 12 horas, y una 20 tercera fase en baño de agua a temperaturas entre temperatura ambiente y 70°C, preferentemente a una temperatura entre 60 y 70°C, y más preferentemente a unos 65°C, y, opcionalmente, una cuarta fase en la que se mantiene en reposo el descongelado durante al menos cinco 25 minutos. Dicho ciclo se repite al menos dos veces, preferentemente 4 veces, hasta que se obtiene un concentrado de lisado celular que contiene un resto celular y el principio activo;

30 - separar el resto celular del principio activo sometiendo el concentrado de lisado celular a filtración de flujo cruzado con diafiltración en una membrana de tamaño de poro inferior o igual a 0,22 micras con un rango de dilución de 1:10, para obtener un filtrado de extracto proteico bruto que contiene un principio activo que comprende proteínas, péptidos y moléculas provenientes de 35

la lisis celular;

- concentrar el filtrado utilizándose un filtro de tamaño de poro tal que las proteínas de peso molecular superior a 5000 daltons quedan retenidos por encima del

5 filtro en una solución acuosa;

- filtración estéril del filtrado concentrado por un filtro de tamaño de poro igual o inferior a 0,22 micras hasta obtener un primer extracto proteico esterilizado que contiene el principio activo.

10 En una realización preferida del procedimiento según la invención, el primer extracto proteico esterilizado se mezcla con al menos un segundo extracto proteico preparado análogamente al primer extracto.

15 Así, en una realización preferente del procedimiento, el primer extracto proteico esterilizado se obtiene a partir de al menos una cepa de dicho primer grupo y el segundo extracto proteico esterilizado se obtiene a partir de al menos un cepa de dicho segundo grupo.

20 Según otra realización preferida del procedimiento, el primer extracto proteico esterilizado y el segundo extracto proteico esterilizado, se mezclan además con un tercer extracto proteico esterilizado obtenido a partir de al menos una cepa de dicho tercer grupo, habiéndose preparado dicho tercer extracto proteico esterilizado por procedimientos análogos a los del procedimiento de preparación del primer extracto.

25 En otra realización aún más preferida del procedimiento según la invención el primer extracto proteico esterilizado, el segundo extracto proteico esterilizado, y el tercer extracto proteico esterilizado, se mezclan además con un cuarto extracto proteico esterilizado obtenido a partir de al menos una cepa de dicho cuarto grupo, habiéndose preparado dicho cuarto extracto proteico esterilizado por procedimientos análogos

a los del procedimiento de preparación del primer extracto.

En las realizaciones preferidas anteriormente descritas, preferentemente el primer extracto proteico esterilizado se obtiene a partir de cepas CECT FCM-1 4913, el segundo extracto proteico esterilizado se obtiene a partir de cepas CECT FCM-2 4914, el tercer extracto proteico esterilizado se obtiene a partir de cepas CECT FCM-3 4915, y el cuarto extracto proteico esterilizado se obtiene a partir de cepas CECT FCM-4 4916.

Para obtener un fármaco "multiuso" es decir, con efectos beneficiosos para prevenir y/o tratar una pluralidad de los síndromes más arriba descritos, los extractos proteicos esterilizados se mezclan, en proporciones iguales, por ejemplo 1:1 cuando se mezclan dos extractos, 1:1:1 cuando se mezclan tres extractos, y 1:1:1:1 cuando se mezclan cuatro extractos, en base a sus respectivas concentraciones de proteínas. Claro está que, cuando se desea potenciar los efectos para sólo una o algunas de las aplicaciones farmacéuticas más arriba descritas, pueden mezclarse los distintos extractos en proporciones desiguales, o puede emplearse sólo uno de los extractos.

La invención también se refiere a composiciones que contienen el producto proteico, compuesto por uno o más de los extractos proteicos antes citados, como ingrediente activo, con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Ejemplos de tales composiciones farmacéuticas son composiciones sólidas, tales como tabletas, píldoras, cápsulas, gránulos, o líquidos, tales como disoluciones liofilizados, suspensiones y emulsiones, para administración oral, tópica, parenteral u otras vías de administración. Las dosis de estas composiciones dependen de su formulación, el método de administración así como el lugar de la administración, el individuo a tratar. Otros

factores tales como la edad, el peso corporal, sexo, dieta, duración de la administración, velocidad de excreción, condición del individuo tratado, combinación con otros fármacos, sensibilidades del individuo y el grado de severidad de la enfermedad también deben tenerse en cuenta. 5 La administración puede realizarse continuamente o periódicamente dentro de las dosis máxima toleradas.

Cuando la composición según la invención es una disolución inyectable, el medio líquido es, por 10 ejemplo, agua destilada, quedando formulada la disolución de la siguiente manera:

1 a 99% p/v del producto proteico
0 a 99% v/v de agua destilada
0,02% v/v de fenol
15 0-0,12% v/v de formol de grado farmacéutico al 37%.

Realizaciones de tales disoluciones y de su preparación se especifican en los ejemplos.

La presente invención tiene especial 20 aplicación en el tratamiento de pacientes HIV positivos. Hoy en día, se considera que el efecto inmunosupresor del HIV puede atribuirse a la destrucción de los linfocitos CD4 que se considera que juegan un papel muy relevante en la inmunorespuesta del individuo. Existen indicios para pensar 25 que los productos proteicos de la presente invención estimulan la proliferación de los linfocitos CD4.

Dosis viables para el tratamiento de pacientes con SIDA, son por ejemplo 1,0 o, preferentemente 2,0 unidades en 2 ml de agua para inyecciones, 30 administradas cada dos días intramuscularmente.

Se ha podido comprobar que en pacientes afectados por el SIDA a los que se les inyectaron intramuscularmente dosis de 2,0 unidades de un producto proteico según la invención, experimentaron incrementos en 35 linfocitos CD4 (y también de linfocitos CD8), sin que se

producieran efectos secundarios nocivos de relevancia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Para ilustrar algunos aspectos de la invención, en la descripción detallada de la invención se 5 hará referencia a unas figuras que se anexan, en las que

la figura 1 muestra los resultados de un análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), de un producto proteico de acuerdo con la invención;

10 la figura 2 muestra los resultados de unos análisis Western Blot al que fueron sometidos muestras del producto proteico según la invención;

15 la figura 3 resume los resultados de unos ensayos relativos a la respuesta in vivo de anticuerpos dependientes de células T;

la figura 4 resume los resultados de unos primeros ensayos relativos a la activación in vitro de células B;

20 la figura 5 es el control de los primeros ensayos relativos a la activación in vitro de células B en presencia de lipopolisacáridos (LPS);

la figura 6 resume los resultados de unos ensayos relativos a la activación in vitro de células T;

25 las figuras 7 a 11 resumen los resultados de varios ensayos relativos a la blastogénesis de células T.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

A continuación se ilustrará la invención en base a algunos ejemplos de carácter no-limitativo.

Ejemplo 1:

30 **Materiales y equipos**

Para obtener un producto proteico según la invención, se seleccionaron las siguientes cepas de bacilos:

* B. Licheniformis CECT FCM-1 4913

* B. Pumilus CECT FCM-1 4913

35 * B. Ciculans CECT-FCM-1 4913

* B. Amiloliciuofaciens CECT FCM-1 4913
* B. Lentus CECT FCM-2 4914
* B. Cereus CECT FCM-2 4914
* B. Subtilis CECT FCM-3 4915
5 * B. Mesentericus CECT FCM-4 4916

y se insertaron en cuatro viales distintos, a saber un primer vial con las DOS cepas CECT FCM-1 4913, un segundo vial con las dos cepas CECT FCM-2-4914, un tercer vial con la cepa CECT FCM-3 4915, y un cuarto vial con las cepas CECT FCM-4 4916.

10 Se dispusieron los siguientes equipos y materiales:

- una incubadora bacteriológica convencional con dispositivo de agitación y regulación de temperatura (36 \pm 1°C);
- recipientes térmicos de baño de agua;
- un equipo convencional PROSTAK de filtración de flujo cruzado con capacidades de filtración de 40 a 800l;
- 15 - un equipo convencional de filtración unidireccional con capacidad de filtración de volúmenes hasta 100 l;
- fermentadores convencionales para el cultivo de microorganismos con capacidades de fermentación para 8,5 l y 800 l;
- 20 - un equipo refrigerador para temperaturas de 4 a 8°C;
- un equipo congelador para temperaturas de -70°C;
- 25 - matraces para la agitación de cultivos con capacidades de 2 a 4 l;
- recipientes de cristal de boca ancha con capacidades de 5 a 20 l;
- membranas de PVDF de 0,22 micras de tamaño de
- 30 poro;

- contenedores de acero inoxidable con capacidad de 50 l, 100 l y 200 l;
- medio de cultivo CM-P, comercializado por INQUIAROMA;
- 5 - agua para inyección (Farmacopea Europea- FE)
- NaCl de calidad bacteriológica (FE);
- fenol ultrapuro (FE);
- solución acuosa de formaldehido de grado farmacéutico al 37% (FE);
- 10 - agente antiespumante STRUKTOLTM J 660.

Propagación primaria de las cepas (=fase PPC)

Se prepararon 2 litros de una primera solución de cultivo, disolviéndose 35 g del medio de cultivo CM-P por cada litro de agua, y se llenaron cuatro matraces con 500 ml de solución de cultivo cada uno. Cada una de las disoluciones se esterilizó a 121°C durante 15 min sin necesidad de ajustar el pH.

En la primera solución de cultivo se inocularon las cepas CECT FCM-1 4913, en la segunda solución las cepas CECT FCM-2 4914, en la tercera solución de cultivo la cepa CECT FCM-3 4915 y en la cuarta solución la cepa CECT FCM-4 4916. Se introdujeron los matraces recipientes con las disoluciones de cultivo inoculadas en una incubadora y se realizaron las incubaciones a 36±1°C y agitación constante a 100 rpm hasta que se obtuvo una suspensión bacilar con una densidad óptica a 620 nm de:

	Grupo de Cepas	OD_{620nm}	tiempo (h)*
30	CECT FCM-1 4913	4	10
	CECT FCM-2 4914	8	15
	CECT FCM-3 4915	7	11
	CECT FCM-4 4916	4	12

* = tiempo de finalización cultivo

Se extrajeron los matraces y se etiquetó cada uno de los matraces con la sigla PPC seguido de la fecha de preparación y el nombre de la cepa inoculada.

Propagación secundaria de las cepas (=fase PSC)

5 Se prepararon 32 litros de una segunda solución de cultivo disolviéndose 35 g de medio de cultivo CM-P por cada litro de agua destilada, ajustándose el pH a 7 ± 0.2 con H_3PO_4 . La segunda solución se vertió en iguales proporciones en cada uno de los 4 fermentadores con 10 capacidad de 8,5 l. Se adicionó 1 ml de STRUKTOL™ J 660 a cada uno de los fermentadores.

La esterilización de la segunda solución de cultivo se realizó durante 15 min a una temperatura de $121^\circ C$.

15 Cada una de las suspensiones bacilares obtenidas en la fase PPS se transfirió respectivamente a uno de los cuatro fermentadores con la segunda solución de cultivo esterilizada, de tal manera que

- el primer fermentador contenía un cultivo con 20 8 l de la segunda solución de cultivo y 500 ml de suspensión bacilar CECT FCM-1 4913;

- el segundo fermentador contenía un cultivo con 8 l de la segunda solución de cultivo y 500 ml de suspensión bacilar CECT FCM-2 4914;

25 - el tercer fermentador contenía un cultivo con 8 l de la segunda solución de cultivo y 500 ml de suspensión bacilar CECT FCM-3 4915;

- el cuarto fermentador contenía un cultivo con 30 8 l de la segunda solución de cultivo y 500 ml de suspensión bacilar CECT FCM-4 4916.

Los cultivos se realizaron en sus respectivos fermentadores a una temperatura de $36\pm1^\circ C$, una agitación del medio de cultivo de 500 ± 100 rpm, con un flujo de aire de 0,8 l/min, y oxígeno disuelto inicial igual a $98\pm2\%$ (durante el cultivo $>0\%$), hasta alcanzar una densidad

óptica a 620 nm de:

Grupo de Cepas	OD _{620nm}	tiempo (h)*
CECT FCM-1 4913	4,4	6
CECT FCM-2 4914	11	10
CECT FCM-3 4915	8,9	9
CECT FCM-4 4916	5,4	8

* = tiempo de finalización cultivo

10 Fermentación principal (fase MF)

En un fermentador se prepararon 800 litros de una tercera solución de cultivo disolviéndose 35g de medio de cultivo CM-P por cada litro de agua, añadiéndose 100 ml de Struktol™ J660, ajustándose el pH a 7_±0,2 con H₃PO₄ 2M, y esterilizándose a 121°C durante 15 minutos. Se inoculó la tercera solución con la segunda solución de cultivo y 8,5 L de suspensión bacilar CECT FCM-1 4913 obtenida en la fase SPS, y se procedió a la fermentación. Posterior y sucesivamente, se prepararon, inocularon y fermentaron de forma análoga sendos lotes de tercera soluciones con las cepas CECT FCM-2 4914, CECT FCM-3 4915 y CECT FCM-4 4916, de manera que se fermentaron

- 8,5 l de cultivo SPS con cepas CECT FCM-1 4913 en 800 l de la tercera solución de cultivo;
- 25 - 8,5 l de cultivo SPS con cepas CECT FCM-2 4914 en 800 l de la tercera solución de cultivo;
- 8,5 l de cultivo SPS con cepas CECT FCM-3 4915 en 800 l de la tercera solución de cultivo;
- 8,5 l de cultivo SPS con cepas CECT FCM-4 30 4916 en 800 l de la tercera solución de cultivo.

Cada uno de los cultivos anteriormente mencionados se fermentaron a 36_±1°C, con agitación a 300 rpm, flujo de aire estéril de 0,8/l min, pH 7_±0,2 y oxígeno disuelto inicial 98_±2% (durante el cultivo >0%), hasta que 35 se alcanzó una fase de crecimiento estacionario en cada

cultivo en una densidad óptica a 620 nm de

Grupo de Cepas	OD _{620nm}	tiempo (h)*
CECT FCM-1 4913	5	10
CECT FCM-2 4914	27	14
CECT FCM-3 4915	27	13
CECT FCM-4 4916	6	12

* = tiempo de finalización cultivo

10 Cosecha

Los cuatro cultivos obtenidos mediante la fase MF se transfirieron en lotes a diversos contenedores de 50 l, etiquetándose cada uno de ellos con las siglas FP, su fecha de preparación y nombre de la cepa cultivada.

15

Preparación de una suspensión celular concentrada (fase SCC)

Se filtró cada uno de los cultivos cosechados en flujo cruzado en el equipo de filtración PROSTAK con una membrana PVDF de 0,22 micras, hasta que se obtuvieron sendos cultivos 20 veces más concentrados que los respectivos cultivos cosechados. Posteriormente, cada uno de los cultivos concentrados se sometió a diafiltración con intercambio de solución salina fisiológica en equipo PROSTAK con filtro de membrana de 0,22 micras con 150 l de solución salina fisiológica, 10 l de cada una de las suspensiones celulares concentradas se transfirieron a contenedores con capacidad de 20 l, etiquetándose cada contenedor con las siglas CCS, su fecha de preparación y nombre de la cepa cultivada.

Obtención de suspensiones de células lisadas por congelación/calentamiento

5 Cada grupo de contenedores con suspensiones celulares concentradas resultantes de la etapa SCC con la misma cepa, se sometió a un proceso criotérmico repitiéndose cuatro veces el siguiente ciclo:

- refrigerar a 4°C durante 3 horas en un equipo refrigerador;
- 10 congelar a -40°C durante 18 horas en un equipo congelador;
- descongelar poniéndose en un equipo de 15 calentamiento con agua caliente a 65°C hasta la total descongelación.

Al final de cada ciclo se realizó una cuenta 15 de UFC y contenido total de proteínas (Kjeldahl) en cada una de las suspensiones de células lisadas, obteniéndose los siguientes valores:

	Ciclo (g/l)	cepa contenida	CFU/ml	proteína total
20	antes ciclo	CECT FCM-1 4913	1×10^8	11,1
	1		$< 10^4$	11,8
	2		2×10^6	10,5
	3		2×10^6	10,5
25	4		2×10^6	10,5

	Ciclo (g/l)	cepa contenida	CFU/ml	proteína total
30	antes ciclo	CECT FCM-2 4914	5×10^9	9,4
	1		1×10^8	20,5
	2		5×10^6	18,3
	3		1×10^4	18,8
	4		2×10^4	20,8

	Ciclo (g/l)	cepa contenida	CFU/ml	proteína total
	antes ciclo	CECT FCM-3 4915	3×10^{10}	14,7
	1		1×10^4	16,8
5	2		1×10^4	17,0
	3		1×10^4	17,0
	4		1×10^4	17,0
10	Ciclo (g/l)	cepa contenida	CFU/ml	proteína total
	antes ciclo	CECT FCM-4 4916	6×10^7	8,3
	1		2×10^6	8,6
	2		2×10^6	9,7
	3		2×10^6	9,1
15	4		1×10^6	9,6

Obtención de extractos proteicos con el ingrediente activo libre de detritus celular (fase IAF)

20 (a) Obtención de extractos proteicos filtrados (fase IAF)

Se sometieron las suspensiones de células lisadas, agrupados respectivamente según las cepas de origen, resultantes del proceso criotérmico a filtración cruzada en equipo PROSTAK con filtro de membrana de 0,22 micras.

Para conocer la cantidad de detritus celulares, se tomaron sendas muestras al final de cada proceso de filtración cruzada y se determinaron los respectivos valores DO_{620} antes y después de centrifugar a 4.000 rpm durante 15 minutos. La diferencia de absorbancia era en cada muestra menor a 0,1 y, por tanto, los extractos proteicos filtrados tenían calidades aceptables. Cada uno de los extractos resultantes de la fase IAF se etiquetó con las siglas IAF, su fecha de preparación, y el nombre de la cepa de origen.

(b) Diafiltración con intercambio de solución salina fisiológica (IAP)

5 Cada uno de los extractos proteicos resultantes de la fase IAP se sometió a diafiltración en equipo PROSTAK con filtro de membrana de 0,22 micras con un volumen de solución salina fisiológica (0,9% m/v) diez veces mayor que el volumen de los extractos proteicos filtrados, controlándose la diafiltración por análisis del contenido total de proteínas (Kjeldahl) en el filtrado, hasta 10 alcanzarse un contenido de proteínas óptimo de:

	Cepa contenida	Proteína total (g/l)
	CECT FCM-1 4913	1,3
	CECT FCM-2 4914	5,9
15	CECT FCM-3 4915	6,9
	CECT FCM-4 4916	2,5

20 Cada uno de los extractos resultantes de la fase IAP (aproximadamente 40 l por cada extracto) se introdujo en un contenedor que se etiquetó con las siglas IAP, su fecha de preparación, y el nombre de la cepa de origen.

Obtención del ingrediente activo concentrado (fase IAC)

25 Cada uno de los extractos resultantes de la fase PAI se sometió a concentración mediante un equipo de filtración a flujo cruzado en un equipo PROSTAK con filtro de membrana de 5000 daltons de diámetro nominal de poro (Pellicon, Biomax 5k, Polietersulfon) para obtener una 30 concentración 1:2, es decir un volumen de aproximadamente 20 l de cada ingrediente activo resultante de la fase IAC.

De cada ingrediente activo IAC se tomaron muestras para determinar su contenido en proteínas (Kjeldahl). El análisis de estas muestras se realiza para 35 tener un control para comprobar que el procedimiento se

está realizando correctamente y, por tanto, es básicamente análogo a la comprobación en la fase IAP.

Los ingredientes activos concentrados resultantes de la fase IAC se introdujeron en sendos 5 contenedores etiquetados con las siglas IAC, la fecha de preparación, y el nombre de la cepa de origen.

Obtención del principio activo estéril (fase IAE)

Cada uno de los ingrediente activos 10 concentrados resultantes de la fase IAC se sometió a filtración en un equipo unidireccional con membrana PVDF de 0,22 micras de poro. De cada principio esterilizado se tomó una muestra para ensayo de esterilidad después de la filtración. El criterio de aceptación es que la retención 15 de microorganismos en el filtro sea menor de $10^7/\text{cm}^2$. En el presente caso, se obtuvieron los siguientes valores:

Cepa contenida	Antes de la filtración	Retención filtro	Después de la filtración
CECT FCM-1 4913	<10	<110	estéril
CECT FCM-2 4914	40	7×10^2	estéril
CECT FCM-3 4915	60	4×10^2	estéril
CECT FCM-4 4916	<10	<110	estéril

25

También se analizó la concentración de proteínas (Kjeldahl) para llevar un control del proceso y poder comprobar que éste se ha realizado correctamente. Para ello, se coge una muestra de la solución y se mide la 30 concentración de proteína. Este paso es análogo a la comprobación en la fase IAP.

Los principios activos resultantes se introdujeron en envase Nalgene etiquetados con las siglas IAE, la fecha de preparación, y el nombre de la cepa de origen, y se almacenaron a 4°C en un refrigerador. 35

Preparación del producto proteico a granel (fase G)

En recipiente adecuado, se dispusieron 100 l de agua para inyección y se añadieron, bajo agitación constante, fenol a una concentración de 0,2% (m/v), con respecto a un volumen de 200 l, solución de formaldehido a una concentración de 0,02% (v/v), también con respecto al volumen de 200 l, y principios activos esterilizados provenientes de la fase IAE, en una relación de IAE CECT FCM-1 4913 : IAE CECT FCM-2 4914 : IAE CECT FCM-3 4915 : IAE CECT FCM-4 4916, de 1:1:1:1, con referencia a sus respectivas concentraciones de proteínas. A la mezcla así obtenida, se añadió agua para inyección hasta completar un volumen de aproximadamente 200 l y se mantuvo en agitación la mezcla resultante durante 30 minutos, obteniéndose el producto a granel en bruto.

El producto a granel, se sometió a filtración estéril empleándose un equipo de filtración unidireccional con membrana acoplada PVDF, de 0,22 micras, obteniéndose un producto a granel estéril. Se sometió una muestra a pruebas de esterilidad y de concentración de proteínas (Kjeldahl) siguiéndose las sistemáticas y criterios seguidos en las pruebas de esterilidad y análisis de la proteína de las etapas anteriores.

El producto a granel estéril se envasó en un contenedor de Nalgene etiquetados con la sigla G, la fecha de preparación, y los nombres de la cepas de origen, y se almacenó a 4°C en un refrigerado.

30 Preparación del producto dosificado para inyecciones

El producto a granel estéril se dispensó en ampollas a razón de 2 ml por ampolla.

Ejemplo 2: Se analizaron tres muestras del producto a granel obtenido en el ejemplo 1, para caracterizar su

componente proteico mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). La muestras analizadas no precisaron preparación previa.

5 La proteínas de cada una de las muestras se separaron mediante técnicas PAGE, en geles estándar tris-glicina BIORAD 10% policrilamida, de BIORAD, EE.UU.

10 Se empleó un tampón desnaturilizador con 10% SDS y 5% 2-mercaptopropano. El tampón de electrodo era el tampón Tris-glicina/SDS empleado convencionalmente para este tipo de gel (método de Laemmli).

Los parámetros de separación fueron 125 V, 30 mA (condiciones de partida) durante aproximadamente 90 min.

15 A continuación los geles se colorearon con azul Coomassie y se destiñeron para mostrar las bandas de proteínas, de acuerdo con el siguiente protocolo:

Solución de tintado de los geles (a 500 ml)

	Azul Coomassie	500 mg
	etanol	200 mg
20	agua destilada	250 ml
	ácido acético glacial	50 ml

Cada gel coloreó con 100 ml de solución y se dejó permanecer allí durante al menos 30 minutos.

25

Solución de destintado de los geles (a 500 ml)

	etanol	60 ml
	agua destilada	400 ml
30	ácido acético glacial	40 ml

Cada gel permaneció en esta solución durante una noche.

35 Los resultados del ensayo PAGE se muestran en la figura 1 en la que los números 1 - 2 tienen los siguientes significados:

1 = Columna de Sigma Marker No. M-4038

2 = Columnas de los productos proteicos

Como puede apreciarse, esta figura muestra diferentes bandas de distintas intensidades pero patrones de bandas prácticamente idénticos de los tres productos ensayados, lo cual es indicativo de que las muestras tenían la misma composición de proteínas.

Ejemplo 3: Se tomaron otras dos muestras del producto a granel del ejemplo 1 que se sometieron a análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en las mismas condiciones que las descritas en el ejemplo 1.

Posteriormente, las proteínas de cada muestra, separadas por PAGE de acuerdo con sus pesos moleculares, se electrotransfirieron a una sola membrana de nitrocelulosa para permitir ulteriores análisis. La metodología correspondiente está descrita por Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor (1989).

Se utilizó una cámara de electrotransferencia LINUS, con tris-glicina de LINUS como tampón de electrotransferencia, a 200 mA, 40 V y durante 2 horas.

Las membranas sobre las que se transfirieron las proteínas separadas por PAGE correspondientes a cada una de las muestras se sometieron a inmunoensayo con anticuerpos policlonales producidos en conejos que se habían obtenido previamente mediante tratamiento con un lote diferente del producto proteico obtenido de acuerdo con el método descrito en el ejemplo 1 y que se encontraba en suero de conejo almacenado a -180°C.

Dado que la reacción antígeno-anticuerpo es muy específica y, por tanto la unión del producto proteico a las bandas, cada una de las cuales corresponde a una proteína de la preparación, generada por cada una de las muestras es indicativa de la presencia de proteínas comunes

en la preparación empleada para inmunizar los conejos, y, en consecuencia, puede servir de control de calidad de las nuevas preparaciones que se generaron.

5 Para la obtención del suero con anticuerpos policlonales generados en conejo del producto proteico según la invención se procedió de la siguiente manera.

10 Se seleccionaron dos conejos albinos New Zealand White, un macho y una hembra, jóvenes y sanos y se mantuvieron aislados y en observación durante 5 días para la aclimatación al entorno de la instalación. Despues del periodo de aclimatación y no habiéndose podido observar ninguna anomalía en los animales, se siguió el siguiente programa:

Vía de administración: inyección intramuscular

15 Días de administración: 1, 7, 14, 17

20 La administración intramuscular se realizó mediante jeringuillas desechables con agujas de calibre 16x0,5mm y se aplicaron a cada animal en la cara posterior de las pata trasera, alternando los lados derecho e izquierdo.

25 El día 23 se dió por finalizado el ensayo y se procedió al sacrificio de los animales, previamente anestesiados por inyección intraperitoneal de pentotal sódico en solución acuosa, por exanguinación, extrayéndose la sangre por punción cardiaca. La sangre se recogió sin ningún tipo de aditivo, y el suero se obtuvo por centrifugación a baja velocidad.

30 El suero obtenido (40ml) se homogeneizó, alicuotó en criotubos de 1 y 4,5ml, referenciado como "Suero-97" y se congeló a -180°C en nitrógeno líquido.

La metodología seguida es en sí convencional y corresponde a los descrito en:

35 Donovan, J. y Brown, P., 1995a, Parenteral injections in current protocols in immunology; 1.6.1-1.6.10; John Wiley & Sons, New York

Current Protocols in Molecular Biology, 1994,
Ed. Virginia Benson Chanda

Hurrell J.G.R. ed. 1982, Monoclonal Hybridoma
Antibodies: Techniques And Applications, CRC Press, Boca
5 Raton, Fla.

Lagone, J.J. y Van Vunakis, H.H. Eds. 1986,
Immunological Techniques, Part I: Hybridoma Technology And
Monoclonal Antibodies, Methods Enzymol., 121:1-947

En vistas de que es posible detectar
10 anticuerpos primarios, que se han unido a las proteínas,
empleándose una técnica que implica el uso de un segundo
anticuerpo marcado generado en un huésped diferente del que
se usó para la generación del primer anticuerpo, se empleó
también tal segundo anticuerpo generado en cabras, sensible
15 a la luz y a cadenas pesadas de IgG de conejo, y que en
consecuencia era capaz de detectar cualquier anticuerpo de
conejo ligado a la proteínas en las membrana de
nitrocelulosa. Cada uno de los segundos anticuerpos
presenta un marcador (peroxidasa de rábano picante, de
20 PIERCE, Rockford, Illinois, Estados Unidos de América) que
permite la visualización de la presencia de tales
anticuerpos en la membrana cuando se añade un reactivo, 4-
cloronaftol, que produce una coloración violeta.

El segundo anticuerpo empleado en el presente
25 ensayo fué un anticuerpo comercial IMMUNOPURE GOAT ANTI-
RABBIT IgG (H+L) (nº de producto: 31460; nº de ote:
96060545) de PIERCE de Rockford, Illinois, Estados Unidos
de América.

Cada una de las bandas violetas en cada una
30 de las membranas de nitrocelulosa corresponde a una
proteína específica que también se encontraba en la
preparación de control del producto proteico que se había
empleado para inmunizar los dos conejos, de cuyo suero se
había extraído el primer anticuerpo.

35 Para el tratamiento de cada una de las

membranas se emplearon las siguientes composiciones:

Solución 1: PBS (sin Ca ni Mg) 300 ml
 Tween 20 150 μ l

Solución 2: solución 1 50 ml
 5 BSA 500 mg
 Leche en polvo 2,5g

Solución 3: solución 1 50 ml
 BSA 250 mg

10

Solución de lavado:

PBS (sin Ca ni MG) 200 ml
 leche en polvo 1 g
 Tween 20 100 μ l

15 Primera solución de anticuerpo (1/100):

primer anticuerpo 200 μ l
 solución 3 20 ml

Segunda solución de anticuerpo (1/1500):

segundo anticuerpo (PIERCE) 60 μ l
 20 solución 3 30 ml

solución Tris-HCl:

Tris HCl 160 mg
 NaCl 820 mg
 agua destilada 100 ml

25 solución 4-CN:

4-cloronaftol (PIERCE) 30 mg
 etanol 10 ml

solución reveladora:

solución Tris-HCL 50 ml
 solución 4-CN 5 ml
 H₂O₂ 10%

Cada membrana de nitrocelulosa con las proteínas transferidas, se sometió al siguiente tratamiento:

* Doble lavado en la solución 1 durante 1 min;
* Incubación en la solución 2 durante 8 horas;
* Doble lavado en la solución 1 durante 30 min;
* Incubación en la solución del primer
5 anticuerpo durante 2 horas;
* Cuatro lavados en la solución de lavado
durante 10 min;
* Incubación durante 2 horas en la solución del
segundo anticuerpo;
10 * Cuatro lavados en la solución de lavado
durante 10 min;
* Revelado en la solución de revelado durante
30 min;
* Lavado con agua ultrapura y mantenimiento en
15 oscuridad hasta el momento en el que se realizan las
fotografías.

Después de este tratamiento, las membranas de nitrocelulosa se fotografiaron. Las fotografías se muestran en la fig. 2.

20 De acuerdo con lo que se desprende de la fig. 2, las muestras analizadas mostraron patrones de bandas e intensidades de bandas prácticamente idénticas, es decir, fueron homogéneas entre sí en cuanto a sus composiciones en proteínas y frente al suero de conejo.

25 **Ensayos de actividad biológica**

Se evaluó la inmunoestimulación en base a ensayos realizados con muestras del producto proteico obtenidas según el ejemplo 1. Las muestras se identifican como FR-91.

30 1) **Respuesta in vivo T-dependiente usando el ensayo de células formadoras de plaquetas**

Se inmunizaron dos ratones con 0,025-0,3 ml de FR-91 por cada ratón.

35 Los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical y se extrajo el bazo de cada uno.

Después de cuatro días, se mezclaron las inmunoglobulinas conjugadas con proteínas SRBC con los linfocitos esplénicos, entre los que se encuentran células productoras de anticuerpos específicos, y se incubaron en un medio semisólido de soporte para permitir que los anticuerpos secretados se unan con la superficie de los eritrocitos. A continuación, se añadió un complemento con especificidad contra anticuerpos conjugados a SRBC a la mezcla, después de lo cual se midieron las zonas libres de lisis (placa) para evaluar la activación de linfocitos.

De acuerdo con lo que se desprende de la fig. 3, la muestras con FR-91 presentaron un número aumentado de células productoras de anticuerpos T-dependientes en ratones inmunizados con células sanguíneas rojas de oveja, lo cual es indicativo de que FR-91 es eficaz en el sistema inmune relacionado con muchos tipos de linfocitos.

2) Activación in vitro de células B, empleándose ensayo de células formadoras de placas

Se añadieron muestras de FR-91 a esplenocitos realizándose concentraciones finales desde 100:1 (1%) hasta 10000:1 (0,01%) y se midió el nivel de células productoras de anticuerpos T-dependientes con o sin lipopolisacáridos empleándose un ensayo de células formadoras de plaquetas.

De acuerdo con lo que se desprende de las figuras 4 y 5, la adición de FR-91 prácticamente no causó incremento alguno en la proliferación o activación de células B, al tratarse esplenocitos con o sin lipopolisacáridos.

3) Activación in vitro de células T

Al cultivarse conjuntamente linfocitos de dos diferentes cepas endogámicas, las células empiezan a proliferar en respuesta a las diferencias antigenicas en los linfocitos alogénicos. La intensidad de esta reacción de linfocitos mixtos (MLR) puede cuantificarse añadiéndose timidina marcada con tritio al medio de cultivo. Dado que

las células proliferan, la timidina radioactiva se incorpora en el ADN de las células descendientes. El grado de la proliferación se determina cosechándose las células, sometiéndolas a lisis, y midiéndose la cantidad de timidina radioactiva incorporada en el ADN la cual es directamente proporcional al nivel de proliferación.

En base a la metodología anteriormente definida, se realizó el siguiente ensayo:

* Se mezclaron linfocitos de dos diferentes 10 cepas endogámicas en unos micropocillos.

* Se añadieron muestras diluidas en serie de FR-91 en concentraciones 100:1, 1000:1 y 10000:1 a los micropocillos.

* Después de cultivar 4 días, se añadió 15 timidina tritiada [³H] a las respectivas mezclas (C₁₀³H₁₄N₂ O₅; SIGMA de SIGMA Corp., EE.UU.).

* Después de cultivar durante 20 horas, se cosecharon células de los cultivos en los micropocillos en una tira de papel-filtro, y se midió la timidina [³H] incorporado en el ADN de las respectivas muestras y se compararon con una muestra de control sin FR-91.

De acuerdo con lo que se desprende de la figura 6, FR-91 incrementó fuertemente la proliferación de células T.

25 4) **Blastogénesis de células T**

Se añadieron muestras de FR-91 diluidas en serie a esplenocitos, con concentraciones finales de 100:1, 1000:1 y 10.000:1 y se introdujeron en micropocillos.

30 Se trataron micropocillos respectivamente identificados, con lipopolisacáridos, mitógeno de pokeweed, fitohematoglutinina, concanavalina A como mitógeno estándar, a una concentración final de 1 μ g/pocillo.

Se midió el nivel de proliferación de células T y B mediante ensayos de incorporación de timidina [³H].

35 Los resultados se reflejan en las figuras 7 - 11.

De acuerdo con lo que se desprende con la fig. 7, FR-91 incremento intensamente la inmunidad de esplenocitos sin ningún mitógeno.

La fig. 8 muestra que FR-91 produce un efecto 5 sinérgico con concanavalina A, la cual es un mitógeno de las células T.

La fig. 9 evidencia que FR-91 presenta un sinergismo fuerte con fitohematoglutinina, la cual es un mitógeno de las células T.

10 La fig. 10 evidencia que FR-91 y los lipopolisacáridos, los cuales son mitógenos de las células B, no presentan sinergia alguna.

15 La fig. 11 demuestra, a una concentración de 100:1, que FR-91 produce algún efecto sinérgico con mitógeno de pokeweed, el cuál es un mitógeno común de T y B.

20 De lo anterior se desprende que FR-91 incrementa sustancialmente la proliferación y activación de células T, pero no presenta efectos en cuanto a las células B.

REIVINDICACIONES

1. Producto proteico que comprende fracciones de péptidos, proteínas y otras moléculas, extraídos de bacilos apatógenos, caracterizado porque
 - 5 - el producto es al menos un extracto proteico y comprende proteínas, péptidos y otras moléculas, obtenidos a partir de lisis celular de al menos una de las de cepas de bacilos termorresistentes y esporulados, seleccionadas de al menos uno de los siguientes grupos:
 - 10 - un primer grupo compuesto por cepas de B. Licheniformis, B. Circulans 2, B. Pumilus, B. Macerans, B. Amilolicofaciens, y cepas modificadas de las mismas;
 - un segundo grupo compuesto por cepas de B. Cereus 1, B. Cereus 2, B. Lentus 1, B. Lentus 2 y cepas modificadas de las mismas;
 - un tercer grupo compuesto por cepas de B. Subtilis y cepas modificadas de las mismas;
 - un cuarto grupo compuesto por cepas de B. Mesentericus y cepas modificadas de las mismas.
- 20 2. Producto proteico según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende
 - al menos una primera fracción de proteínas, péptidos y moléculas obtenidas a partir del fraccionamiento celular, seleccionada entre extractos de B. Licheniformis, B. Circulans 2, B. Pumilus, B. Macerans, B. Amilolicofaciens;
 - al menos una segunda fracción de proteínas, péptidos y moléculas obtenidas a partir del fraccionamiento celular, seleccionada entre extractos de B. Cereus 1, B. Cereus 2, B. Lentus 1, B. Lentus 2;
 - al menos una tercera fracción de proteínas, péptidos y moléculas obtenidas a partir del fraccionamiento celular, seleccionada entre extractos de B. Subtilis;
 - 35 - al menos una cuarta fracción de proteínas,

péptidos y moléculas obtenidas a partir del fraccionamiento celular, seleccionada entre extractos de B. Mesentericus.

3. Producto proteico según la reivindicación 1, 5 caracterizado porque comprende

- al menos un primer extracto que contiene proteínas, péptidos y moléculas, obtenido a partir del fraccionamiento celular a partir de cepas de bacilos del género Subtilis;

10 - al menos un segundo extracto que contiene proteínas, péptidos y moléculas, obtenido a partir del fraccionamiento celular de cepas de bacilos del género Cereus;

15 - al menos un tercer extracto que contiene proteínas, péptidos y moléculas, obtenido a partir de cepas de bacilos del género Mesentericus;

- al menos un cuarto extracto que contiene proteínas, péptidos y moléculas, obtenido a partir de cepas de bacilos del género Licheniformis;

20 - al menos un quinto extracto que contiene proteínas, péptidos y moléculas, obtenido a partir de cepas de bacilos del género Lentus;

- al menos un sexto extracto que contiene proteínas, péptidos y moléculas, obtenido a partir de cepas 25 de bacilos del género Pumilus.

4. Producto proteico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque las cepas de bacilos están seleccionadas entre cepas naturales y cepas modificadas.

30 5. Producto proteico según la reivindicación 1, caracterizado porque las cepas de bacilos del primer grupo son cepas modificadas CECT FCM-1 4913.

6. Producto proteico según la reivindicación 1, caracterizado porque las cepas de bacilos del segundo grupo son cepas modificadas CECT FCM-2 4914.

5 7. Producto proteico según la reivindicación 1, caracterizado porque las cepas de bacilos del tercer grupo son cepas modificadas CECT FCM-3 4915.

10 8. Producto proteico según la reivindicación 1, caracterizado porque las cepas de bacilos del cuarto grupo son cepas modificadas CECT FCM-4 4916.

15 9. Producto proteico según la reivindicación 2 o 3, caracterizado porque las cepas modificadas de B. Subtilis son cepas CECT FCM-3 4915.

20 10. Producto proteico según la reivindicación 2 o 3, caracterizado porque las cepas modificadas de B. Cereus son cepas CECT FCM-2 4914.

11. Producto proteico según la reivindicación 2 o 3, caracterizado porque las cepas modificadas de B. Mesentericus son cepas CECT FCM-4 4916.

25 12. Producto proteico según la reivindicación 2 o 3, caracterizado porque las cepas modificadas de B. Licheniformis son cepas CECT FCM-1 4913.

30 13. Producto según la reivindicación 2 o 3, caracterizado porque las cepas modificadas de B. Lentus son cepas CECT FCM-2 4914.

35 14. Producto según la reivindicación 2 o 3, caracterizado porque las cepas modificadas de B. Pumilus son cepas CECT FCM-1 4913.

15. Procedimiento para la obtención del extracto proteico, caracterizado porque comprende las etapas de

- seleccionar al menos una cepa

5 termorresistente y esporulada de al menos uno de los siguientes grupos:

- un primer grupo compuesto por cepas de B. Licheniformis, B. Circulans 2, B. Pumilus, B. Macerans, B. Amilolicofaciens, y cepas modificadas de las mismas;
- 10 - un segundo grupo compuesto por cepas de B. Cereus 1, B. Cereus 2, B. Lentus 1, B. Lentus 2 y cepas modificadas de las mismas;
- un tercer grupo compuesto por cepas de B. Subtilis y cepas modificadas de las mismas;
- 15 - un cuarto grupo compuesto por cepas de B. Mesentericus y cepas modificadas de las mismas;
- añadir una inoculación de dicha cepa a una disolución acuosa de un medio de cultivo, para obtener un medio de cultivo inoculado,
- 20 - ajustar la temperatura del medio de cultivo inoculado en función de un crecimiento óptimo de la cepa;
- cultivar la cepa hasta alcanzar una densidad óptica máxima hasta obtener un cultivo que contiene una masa bacilar;
- 25 - obtener un extracto proteico de las masas bacilares mediante las etapas de
- separación de la masa bacilar del cultivo hasta obtener bacilos en suspensión; filtración cruzada sobre un filtro con un diámetro de poro inferior a 0,22
- 30 micras hasta obtener un cultivo concentrado con un rango de concentración de 10 a 20;
- someter el cultivo concentrado a diafiltración con intercambio de solución salina fisiológica;
- 35 - obtener un extracto que comprende proteínas,

péptidos y moléculas que forman el principio activo mediante las fases de

- someter el cultivo concentrado a lisis celular, mediante un proceso criotérmico que comprende un 5 ciclo con una primera fase a temperaturas entre 2 y 8°C durante varias horas y una segunda fase de frío a una temperatura inferior a -40°C durante al menos 8 horas, y una tercera fase en baño de agua a temperaturas entre temperatura ambiente y 70°C; repetir dicho ciclo al menos 10 dos veces, hasta obtener un concentrado de lisado celular que contiene un resto celular y el principio activo;
- separar el resto celular del principio activo sometiendo el concentrado de lisado celular a filtración de flujo cruzado con diafiltración en una membrana de tamaño 15 de poro inferior o igual a 0,22 micras con un rango de dilución de 1:10, para obtener un filtrado de extracto proteico bruto que contiene un principio activo que comprende proteínas, péptidos y moléculas provenientes de la lisis celular;
- 20 - concentrar el filtrado utilizando un filtro de tamaño de poro tal que las proteínas de peso molecular superior a 5000 daltons quedan retenidos por encima del filtro en una solución acuosa;
- filtración estéril del filtrado concentrado 25 por un filtro de tamaño de poro igual o inferior a 0,22 micras hasta obtener un primer extracto proteico esterilizado que contiene el principio activo;
- opcionalmente, mezclar el primer extracto proteico esterilizado, con al menos un segundo extracto 30 proteico preparado análogamente al primer extracto.

16. Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado porque la disolución acuosa comprende entre 19 y 200g de un medio cultivo por cada litro de agua de 35 calidad microbiológica.

17. Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado porque la disolución acuosa se ajusta a un pH de $7.0 \pm 0,2$.

5 18. Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado porque la disolución acuosa se esteriliza a al menos 121°C durante 15 a 20 minutos.

10 19. Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado porque la temperatura del medio de cultivo inoculado en función se ajusta a una temperaturas entre 18 a 40°C .

15 20. Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado porque se aplica ventilación forzada por aire filtrado al medio de cultivo inoculado hasta el inicio de la fase de crecimiento de la cepa sometiéndose el medio de cultivo inoculado a una presión de aire de 0,5 a 1 l/min.

20 21. Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado porque el cultivo concentrado se obtiene mediante concentración celular de la masa bacilar en el cultivo mediante centrifugación, ciclón u otros procedimientos en sí convencionales.

25 22. Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado porque antes de la concentración celular de la masa bacilar se separa y analiza una parte alícuota del cultivo antes de la concentración para obtener datos de "bacilos en suspensión" para obtener datos indicativos del grado de la concentración.

30 35 23. Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado porque el cultivo concentrado somete a la diafiltración con un filtro de membrana con un tamaño de

poro igual o inferior a 0,22 micras.

24. Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado porque la segunda fase del ciclo del proceso criotérmico se realiza a - 40 y -50°C durante 8 a 12 horas y porque la tercera fase se realiza a una temperatura entre 60 y 70°C.

10 25. Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado porque el proceso criotérmico se compone de 4 de dichos ciclos.

15 26. Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado porque el calentamiento para alcanzar la descongelación completa del cultivo concentrado se realiza a una temperatura inferior a 65°C.

20 27. Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado porque el descongelado se mantiene en reposo durante al menos 5 minutos en una cuarta fase de cada ciclo del proceso criotérmico.

25 28. Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado porque el primer extracto proteico esterilizado se obtiene a partir de al menos un cepa de dicho primer grupo y porque el segundo extracto proteico esterilizado se obtiene a partir de al menos un cepa de dicho segundo grupo.

30 29. Procedimiento según la reivindicación 28, caracterizado porque el primer extracto proteico esterilizado y el segundo extracto proteico esterilizado, se mezclan además con un tercer extracto proteico esterilizado obtenido a partir de al menos una cepa de dicho tercer grupo, habiéndose preparado dicho tercer extracto proteico

esterilizado por procedimientos análogos a los del procedimiento de preparación del primer extracto.

30. Procedimiento según la reivindicación 29, caracterizado porque el primer extracto proteico esterilizado, el segundo extracto proteico esterilizado, y el tercer extracto proteico esterilizado, se mezclan además con un cuarto extracto proteico esterilizado obtenido a partir de al menos una cepa de dicho cuarto grupo, habiéndose preparado dicho cuarto extracto proteico esterilizado por procedimientos análogos a los del procedimiento de preparación del primer extracto.

31. Procedimiento según la reivindicación 28, caracterizado porque el primer extracto proteico esterilizado se obtiene a partir de cepas CECT FCM-1 4913, el segundo extracto proteico esterilizado se obtiene a partir de cepas CECT FCM-1 4914.

32. Procedimiento según la reivindicación 29, caracterizado porque el primer extracto proteico esterilizado se obtiene a partir de cepas CECT FCM-1 4913, el segundo extracto proteico esterilizado se obtiene a partir de cepas CECT FCM-2 4914 y el tercer extracto proteico esterilizado se obtiene a partir de cepas CECT FCM-3 4915.

33. Procedimiento según la reivindicación 30, caracterizado porque el primer extracto proteico esterilizado se obtiene a partir de cepas CECT FCM-1 4913, el segundo extracto proteico esterilizado se obtiene a partir de cepas CECT FCM-2 4914, el tercer extracto proteico esterilizado se obtiene a partir de cepas CECT FCM-3 4915, y el cuarto extracto proteico esterilizado se obtiene a partir de cepas CECT FCM-4 4916.

34. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 33, caracterizado porque los extractos proteicos esterilizados se mezclan en 5 proporciones iguales referidas a sus respectivas concentraciones de proteínas.

35. Composición farmacéutica caracterizada porque contiene un producto proteico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y un soporte farmacéuticamente aceptable. 10

36. Composición farmacéutica caracterizada porque contiene un producto proteico según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en disolución en un medio líquido. 15

37. Composición según la reivindicación 36, caracterizada porque el medio líquido es una disolución acuosa.

20 38. Composición según la reivindicación 36, caracterizada porque el medio líquido es agua destilada.

25 39. Composición según la reivindicación 38, caracterizada porque contiene 1 a 99% p/v del producto proteico 0 a 99% v/v en peso de agua destilada 0-0,2% v/v de fenol 30 0-0,12% v/v de formol de grado farmacéutico al 37%.

40. Uso de un producto proteico según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la fabricación de medicamentos destinados a la prevención y al tratamiento de 35 trastornos en individuos con síndromes de

inmunodeficiencias.

41. Uso según la reivindicación 40, en la fabricación de medicamentos para la prevención y el 5 tratamiento del SIDA.

42. Uso según la reivindicación 40, en la fabricación de medicamentos para el la prevención y el tratamiento de linfocitopenia T CD₄₊ idiopática.

10

43. Uso de un producto proteico según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la fabricación de medicamentos destinados a la prevención y al tratamiento de trastornos en individuos con síndromes de autoinmunidad.

15

44. Uso según la reivindicación 43, en la fabricación de medicamentos para la prevención y el tratamiento de cualquiera de los síndromes relacionados con esclerosis múltiple, Lupus eritematoso sistémico, artritis 20 reumatoide, espondilitis anquilosante y psoriasis.

25

45. Uso de un producto proteico según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la fabricación de medicamentos destinados a la prevención y al tratamiento de trastornos en individuos afectados por procesos 30 neoplásicos.

35

46. Uso según la reivindicación 45, en la fabricación de medicamentos para la prevención y el tratamiento de cualquiera de los síndromes relacionados con procesos neoplásicos seleccionados entre leucemias, mielomas, linfomas, tumores cerebrales y de la médula espinal, cáncer de piel, neoplasia de tiroides, neoplasias de glándulas suprarrenales, tumores del aparato genitourinario masculino y femenino, tumores cardíacos,

tumores del tracto gastrointestinal, tumores de pulmón, pleura y mediastino, y neoplasias de huesos y cartílagos.

47. Uso de un producto proteico según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la fabricación de medicamentos destinados a la prevención y al tratamiento de trastornos en individuos con síndromes relacionados con enfermedades degenerativas.

10 48. Uso según la reivindicación 47, en la fabricación de medicamentos para la prevención y el tratamiento de la artrosis.

15 49. Uso de un producto proteico según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la fabricación de medicamentos destinados a la prevención y al tratamiento de trastornos en individuos con síndromes relacionados con enfermedades inflamatorias intestinales.

20 50. Uso según la reivindicación 49, en la fabricación de medicamentos para la prevención y el tratamiento de la enfermedad de Crohn.

25 51. Uso según de un producto proteico según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la fabricación de medicamentos destinados a la prevención y al tratamiento de trastornos en individuos con síndromes relacionados con hepatitis.

30 52. Uso según de un producto proteico según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la fabricación de medicamentos destinados a la prevención y al tratamiento de trastornos en individuos causados por priones.

35 53. Uso según la reivindicación 52, en la

fabricación de medicamentos para la prevención y el tratamiento de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.

1/7

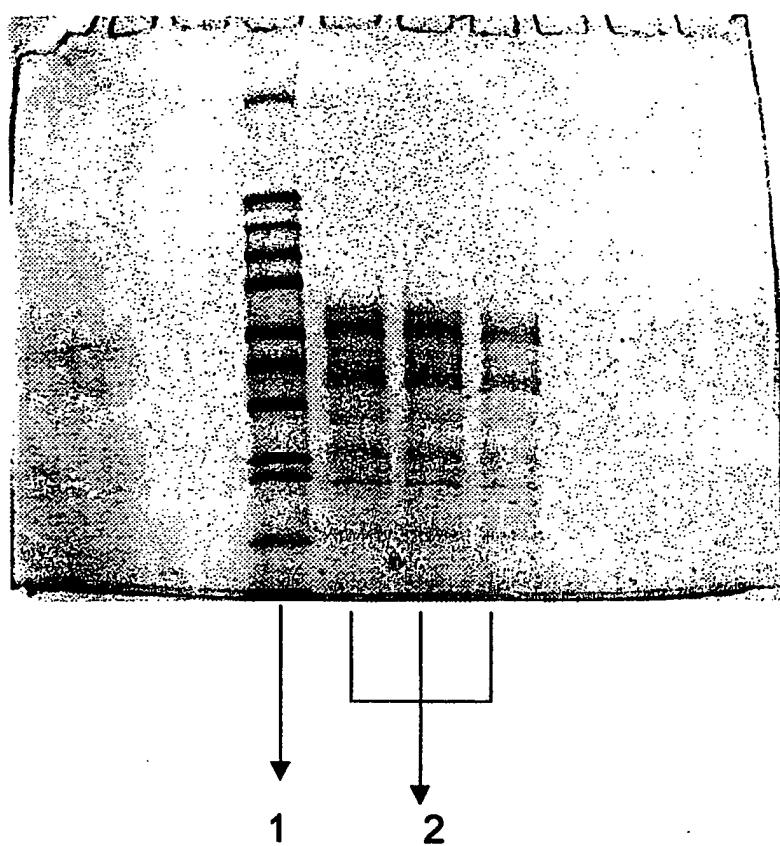


FIG. 1

HOJA DE SUSTITUCION (REGLA 26)

2/7

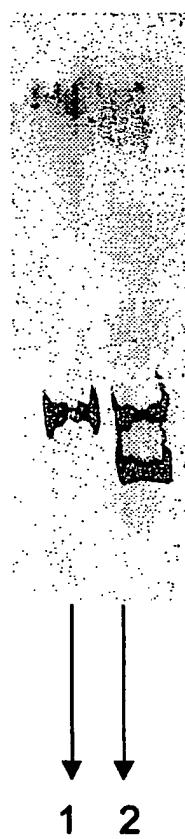


FIG. 2

HOJA DE SUSTITUCION (REGLA 26)

3/7

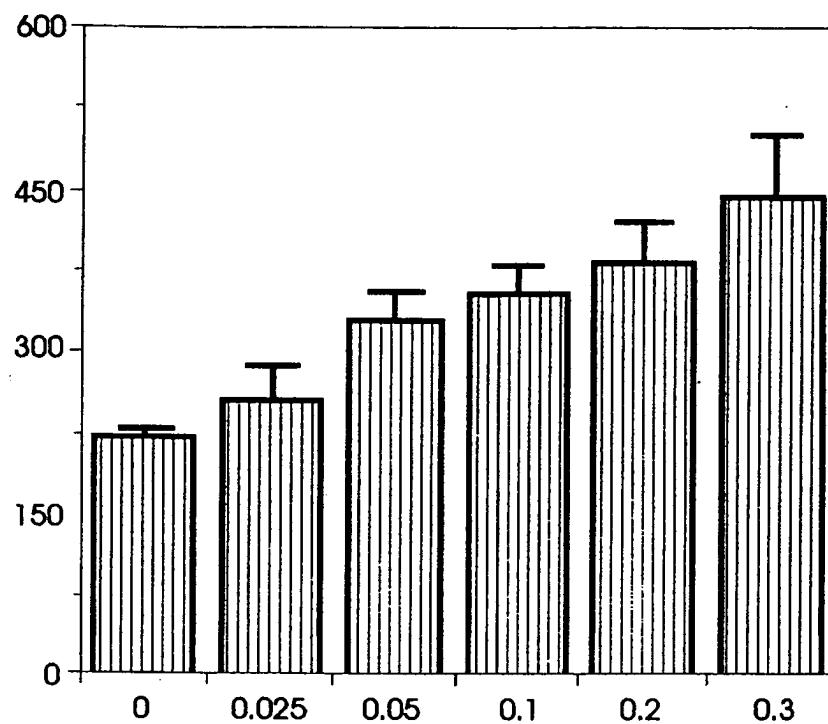


FIG.3

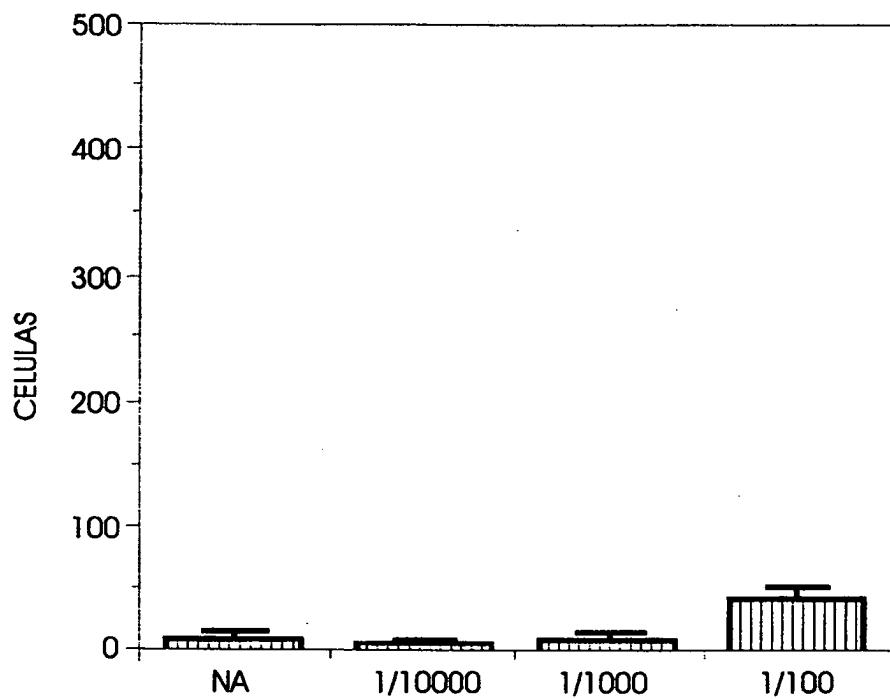


FIG.4

4/7

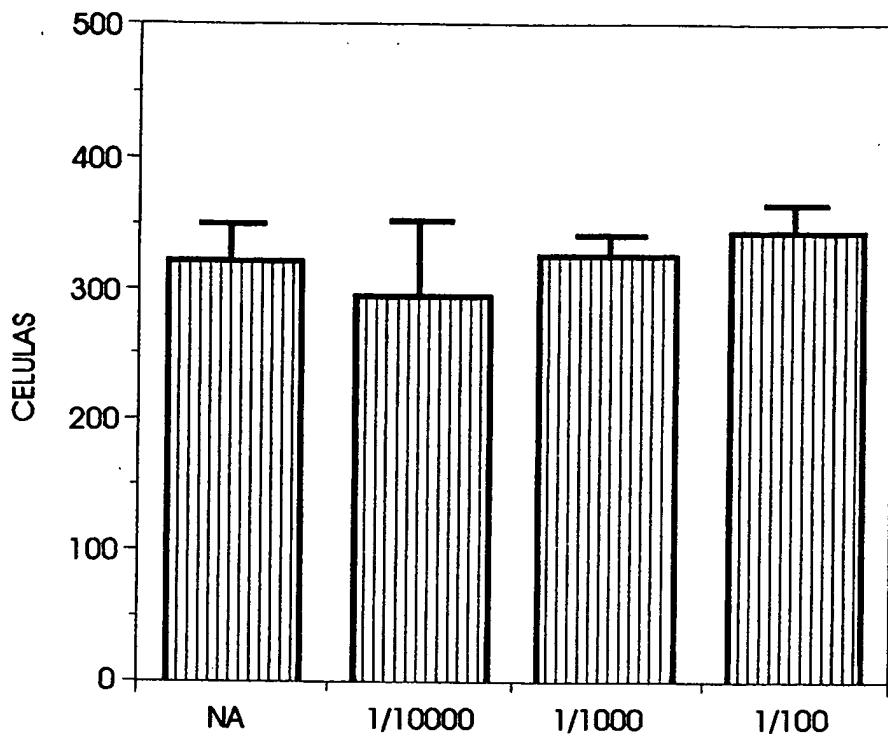


FIG.5

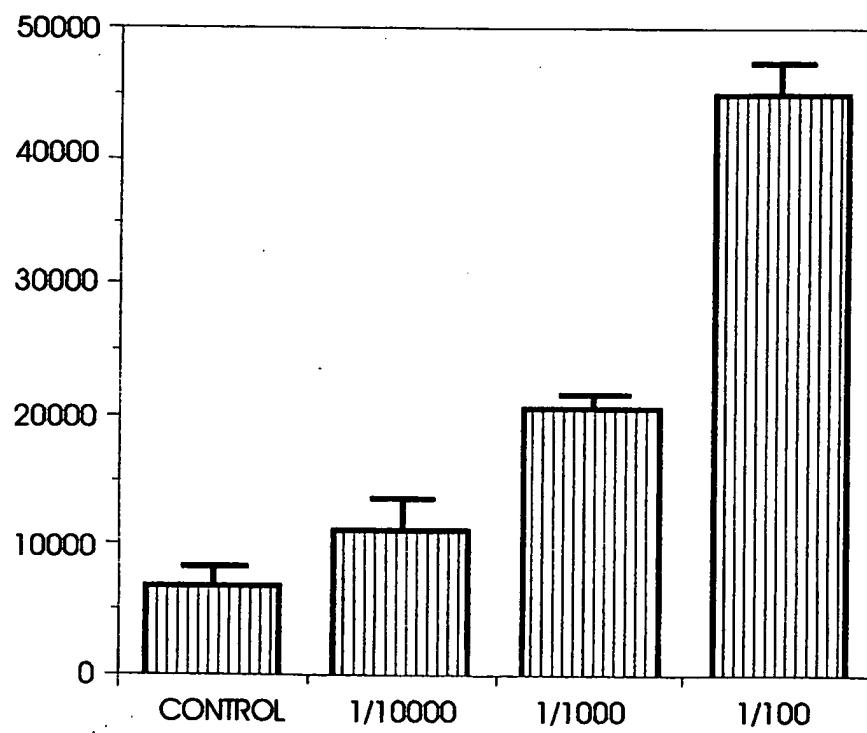


FIG.6

5/7

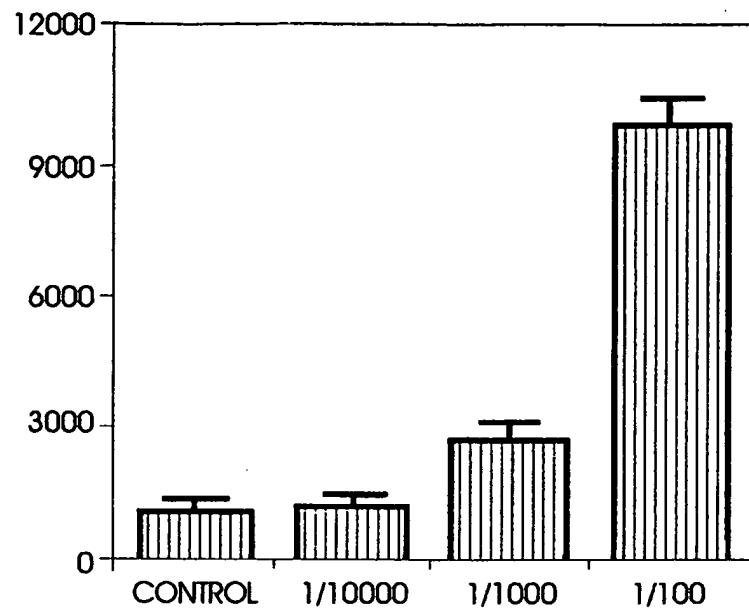


FIG. 7

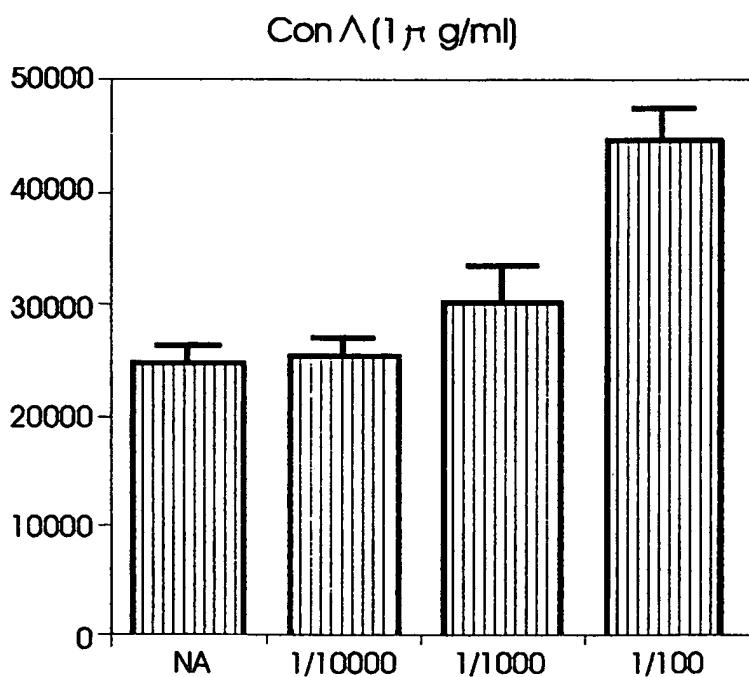


FIG. 8

6/7

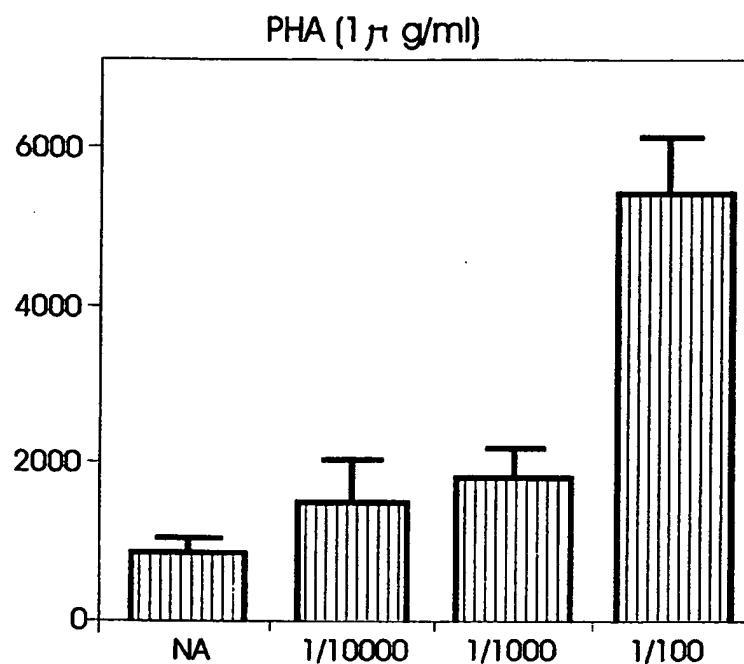


FIG.9

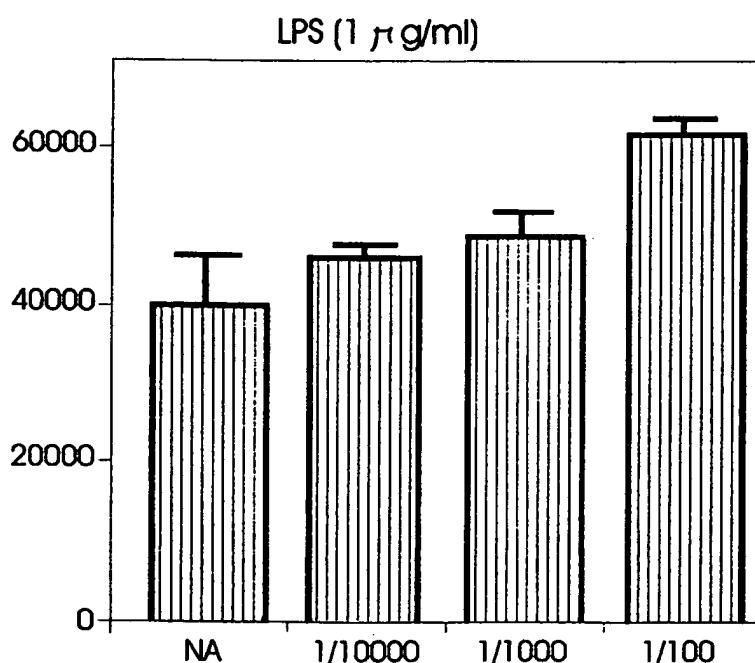


FIG.10

7/7

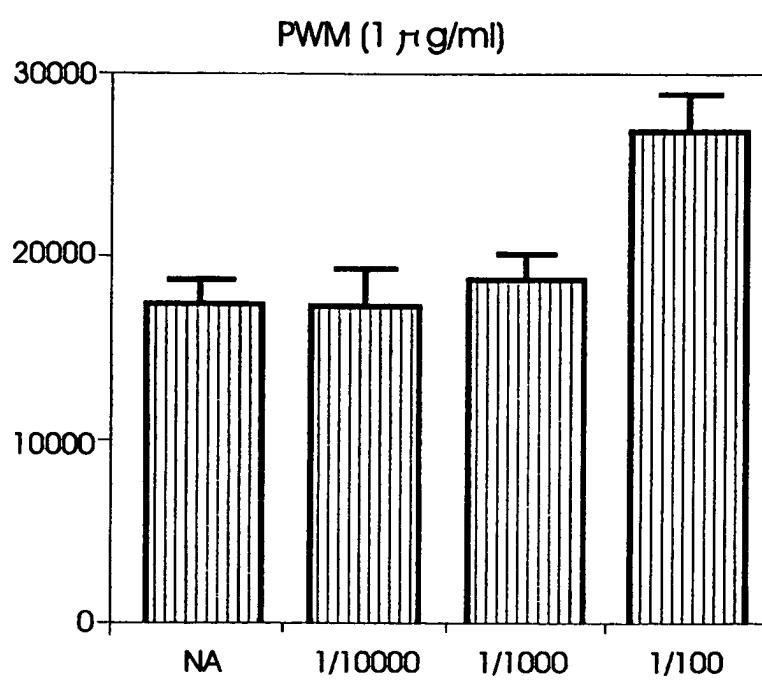


FIG. 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 98/00219A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07K 14/32, A61K 38/16, A61K 35/74

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ES 400418 A (FERNANDO CHACON MEJIAS) 1 January 1975 (01.01.75) the whole document	1-14, 35-38, 40, 43, 45, 46
X	ES 410892 A (FERNANDO CHACON MEJIAS) 1 December 1975 (01.12.75) the whole document	1-14, 35-38, 40, 43, 45, 46
X	Database PAJ en EPOQUE. Japanese Patent Inf. Organisation (TOKIO,JP), JP 60190720 A (KOGYO GIJUTSUIN) 28 September 1985 (28.09.85), abstract	1, 4, 35-38, 40, 43, 45, 46
X	WO 9504539 A1 (AHC INC.) 16 February 1995 (16.02.95), abstract	1, 4, 35-38, 40, 43
A	WO 9422459 A1 (EISAI CO. LTD.) 13 October 1994 (13.10.94), abstract	

<input type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
“A”	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“E”	earlier document but published on or after the international filing date	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“L”	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“O”	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	“&” document member of the same patent family
“P”	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 4 November 1998 (04.11.98)	Date of mailing of the international search report 10 November 1998 (10.11.98)
Name and mailing address of the ISA/ S.P.T.O.	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/ES 98/00219

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES 400418 A	01.01.1975	NONE	
ES 410892 A	01.12.1975	NONE	
JP 60190720 A	28.09.1985	NONE	
WO 9504539 A1	16.02.1995	AU 9472761 JP 7506338	28.02.1995 05.10.1995
WO 9422459 A1	13.10.1994	EP 691848 A1 JP 8509211 W US 5741494 A	17.01.1996 01.10.1996 21.04.1998

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES 98/00219

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁶ C07K 14/32, A61K 38/16, A61K 35/74

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁶ C07K, A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	ES 400418 A (FERNANDO CHACON MEJIAS) 01.01.1975 Todo el documento	1-14,35-38,40,43,45,46
X	ES 410892 A (FERNANDO CHACON MEJIAS) 01.12.1975 Todo el documento	1-14,35-38,40,43,45,46
X	Base de datos PAJ en EPOQUE. Japanese Patent Inf. Organisation (TOKIO, JP), JP 60190720 A (KOGYO GIJUTSUN) 28.09.1985, resumen	1,4,35-38,40,43,45,46
X	WO 9504539 A1 (AHC INC.) 16.02.1995, resumen	1,4,35-38,40,43
A	WO 9422459 A1 (EISAI CO. LTD.) 13.10.1994, resumen	

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento anteriormente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro o otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 4 Noviembre 1998 (04.11.98)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
10 NOV 1998 (10.11.98)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.
nº de fax +34 91 3495304

Funcionario autorizado

M. Novoa Sanjurjo

nº de teléfono + 34 91 349 55 36

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL
Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 98/00219

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
ES 400418 A	01.01.1975	NINGUNO	
ES 410892 A	01.12.1975	NINGUNO	
JP 60190720 A	28.09.1985	NINGUNO	
WO 9504539 A1	16.02.1995	AU 9472761 JP 7506338	28.02.1995 05.10.1995
WO 9422459 A1	13.10.1994	EP 691848 A1 JP 8509211 W US 5741494 A	17.01.1996 01.10.1996 21.04.1998